


 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>4</sup> : <b>C12N 11/02, A61L 27/00, 25/00</b> <b>// C07K 3/20</b>	<b>A1</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 88/ 07078</b> (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. September 1988 (22.09.88)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE88/00165 (22) Internationales Anmeldedatum: 17. März 1988 (17.03.88) (31) Prioritätsaktenzeichen: P 37 09 101.8 (32) Prioritätsdatum: 20. März 1987 (20.03.87) (33) Prioritätsland: DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DR. MÜLLER-LIERHEIM AG [DE/DE]; Behringstraße 6, D-8033 Planegg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : MÜLLER-LIER- HEIM, Wolfgang, Georg, Konrad [DE/DE]; Lichtweg 5, D-8032 Gräfelfing (DE). (74) Anwalt: NÖTH, Heinz; Mozartstraße 17, D-8000 Mün- chen 2 (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (eu- ropäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), SU, US.  Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.
(54) Title: IMMOBILIZATION SUBSTANCE  (54) Bezeichnung: IMMOBILISIERUNGSSUBSTANZ  (57) Abstract  An immobilization substance, characterized by adhesive proteins (adhesins), isolated from extracellular structures, in particular fimbria, pili, external membranes or capsules of Gram-negative bacteria, in particular coli bacteria, for binding cells, in particular mammal cells, tissues, pharmaceutical active principles, antibodies and growth factors to carriers.  (57) Zusammenfassung  Immobilisierungssubstanz, gekennzeichnet durch adhäsive Proteine (Adhäsine), die aus extrazellulären Strukturen, insbesondere Fimbrien, Pili, äußeren Membranen oder Kapseln von Gram-negativen Bakterien, insbesondere Colibakterien, isoliert sind, zur Bindung von Zellen, insbesondere Säugerzellen, Geweben, pharmazeutischen Wirkstoffen, Antikörpern, Wachstumsfaktoren an Trägern.		

### **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
AU	Australien	GA	Gabun	MW	Malawi
BB	Barbados	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BE	Belgien	HU	Ungarn	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	IT	Italien	RO	Rumänien
BJ	Benin	JP	Japan	SD	Sudan
BR	Brasilien	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Schweiz	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CM	Kamerun	LU	Luxemburg	TG	Togo
DE	Deutschland, Bundesrepublik	MC	Monaco	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
FI	Finnland	ML	Mali		

## Beschreibung

### Immobilisierungssubstanz

5

Die Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Immobilisierungssubstanz zur Bindung von biologischem Material an Trägern zu schaffen.

10 Diese Immobilisierungssubstanz ist dadurch gekennzeichnet, daß adhäsive Proteine, die aus extrazellulären Strukturen, insbesondere Fimbrien, Pili, äußeren Membranen oder Kapseln von Gram-negativen Bakterien, insbesondere Colibakterien, isoliert sind, verwendet werden.

15

Diese adhäsiven Proteine (Adhäsine) besitzen typischerweise ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 12 000 bis 30 000 Dalton und können Kohlehydratkomponenten von Glycolipoiden und Glycoproteinen höherer Zellen erkennen. Diese

20 adhäsiven Proteine vermitteln die Adhärens der Bakterien an höhere Zellen (z. B. Erythrozyten, Lymphozyten) und an Gewebe (z. B. Epithel). Diese adhäsiven Proteine werden im allgemeinen von Säugetier-Proteosen nicht gespalten.

25 Diese isolierten adhäsiven Proteine (Glycoproteine) bzw. die entsprechenden Bindungsstellen dieser Proteine oder der Proteinfragmente oder der gegebenenfalls daraus z. B. durch Hydrolyse gewonnenen Polypeptide werden erfindungsgemäß zur Immobilisierung von Zellen, insbesondere Säugerzellen, Gewe-

30 ben, von pharmazeutischen Wirkstoffen, Antikörpern oder Wachstumskörpern an Trägern verwendet. Insbesondere für die Oberflächenaufbereitung von Implantaten lassen sich diese adhäsiven Proteine als Anheftfaktoren für Säugetierzellen bzw. Gewebe verwenden. Die Zellen bzw. Gewebe lassen sich

35 über die adhäsiven Proteine an der Oberfläche eines Implan-

tatgrundkörpers quasi irreversibel binden. Als Wachstumsfaktoren kommen Blutserum oder Bestandteile davon sowie Fibronektin in Frage. Auch eine Kombination aus Stoffwechselprodukten von Zellen und auf biochemischem Weg modifizierten Naturprodukten sind als Wachstumsfaktoren geeignet. Weitere Wachstumsfaktoren können zur Zelldifferenzierung führende Proteine und Knochensubstanz induzierende Proteine sein. Bei den Implantaten kann es sich um extrakorporale oder implantierbare künstliche Organe, Gefäße, Prothesen, Hautersatz, Zahnersatz, künstliche Augenlinsen, Kontaktlinsen und dgl. handeln. Durch kovalente Bindung können die Adhäsine an den Implantatoberflächen gebunden sein.

15 Auch bei der Formulierung von Arzneimitteln lassen sich die adhäsiven Proteine zur Bindung der pharmazeutischen Wirkstoffe, insbesondere von Blutgerinnungsmitteln, an den Trägerkörpern, insbesondere pulverförmigen Trägerkörpern, verwenden.

20 Als Trägerkörper kommen auch Kohlehydratkomponenten von Glycolipoiden und Glycoproteinen enthaltenden höheren Zellen in Frage, da diese von den adhäsiven Proteinen spezifisch erkannt werden.

25 Ferner können die adhäsiven Proteine als Immobilisierungssubstanz für Antikörper produzierende Zellen, insbesondere Säugerzellen, von Gewebe und dgl. verwendet werden. Ferner besteht eine Anwendungsmöglichkeit der Adhäsine in der Endotheliumbildung bei Gefäßverpflanzungen.

30

Eine weitere wichtige Anwendung besteht darin, daß die Adhäsine in der Chirurgie als Gewebekleber zum Einsatz kommen. Da die Adhäsine wasserlöslich sind, können sie als Einkompo-

nentenkleber zur Anwendung kommen. Die Anwendungsgebiete sind insbesondere die Unfallchirurgie, die Weichteilchirurgie und auch die Leberchirurgie, da in diesen Fällen Nähte häufig nicht zum gewünschten Erfolg führen. Gegenüber den  
5 bislang verwendeten Fimbrienklebern, bei denen es sich um einen Zweikomponentenkleber handelt, der während der Operation angemischt und schnell verarbeitet werden muß, und in der Handhabung daher schwierig und nicht ohne Risiko für die Blutgerinnung ist, treten bei dem Adhäsine-Gewebekleber die-  
10 se Nachteile nicht auf. Da Adhäsine wasserlöslich sind, können sie in Form eines Einkomponentenklebers verwendet werden.

Bevorzugt kommen Nicht-Fimbrien-assoziierte Adhäsine zum  
15 Einsatz, da diese sich mit größerer Ausbeute von der Zelloberfläche der Bakterien isolieren lassen. Diese Nicht-Fimbrien-assoziierten Adhäsine, welche bevorzugt aus Escherichia Coli-Bakterien gewonnen werden, binden selektiv an Humanzellmembranen. Das Molekulargewicht liegt in der  
20 Größenordnung von 12 000 bis 30 000 Dalton, bevorzugt im Bereich von 20 000 Dalton. Die Nicht-Fimbrien-assoziierten Adhäsine können Aggregate bilden. Dieses dann apparente Molekulargewicht nach der Aggregatbildung beträgt etwa  
10<sup>6</sup> bis 10<sup>7</sup> Dalton. Ferner sind diese Adhäsine wasserlöslich.

25 Für die Gewinnung der Adhäsine läßt sich folgendes Verfahren durchführen. Auf Agar lassen sich in beispielsweise Petrischalen die entsprechenden E. Coli-Bakterien kultivieren. Zur Trennung der Adhäsine von den Zellmembranen der Bakterien  
30 werden diese zunächst ultrabeschallt und dann durch Ultrazentrifugieren getrennt und nachfolgende chromatographische Aufreinigung gereinigt. Man erhält bei der Kultivierung in 100 Petrischalen mit 14 cm Durchmesser etwa 40 bis 50 mg grob gereinigte Adhäsine bzw. etwa 30 mg hoch gereinigte Adhäsine.

- 4 -

Die gewonnenen Nicht-Fimbrien-assoziierten Adhäsine können je nach E. Coli-Stamm folgende Spezifitäten aufweisen:

Spezifitäten bei den Nicht-Fimbrien-assoziierten

5 Adhäsinen (NFA)

NFA-1: Rezeptor ist das Glycophorin A (Vorkommen ist vor allem auf Erythrozyten, Bindung aber auch an Nierenzellen)

10

NFA-2: Rezeptor ist das Glycophorin A

NFA-3: Rezeptor ist das Blutgruppenantigen N

15 NFA-4: Rezeptor ist das Blutgruppenantigen M

NFA-5: Rezeptor ist das Blutgruppenantigen M.

20

25

30

5

10

15

20

**Patentansprüche:**

1. Immobilisierungssubstanz, gekennzeichnet durch adhäsive  
25 Proteine (Adhäsine), die aus extrazellulären Strukturen,  
insbesondere Fimbrien, Pili, äußeren Membranen oder Kapseln  
von Gram-negativen Bakterien, insbesondere Colibakterien,  
isoliert sind, zur Bindung von Zellen, insbesondere Säuger-  
zellen, Geweben, pharmazeutischen Wirkstoffen, Antikörpern,  
30 Wachstumsfaktoren an Trägern.

2. Immobilisierungssubstanz nach Anspruch 1, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß durch die Adhäsine spezifisch Kohle-  
hydratkomponenten von Glycolipoiden oder Glycoproteinen er-  
35 kannt bzw. adsorptiv gebunden werden.

3. Immobilisierungssubstanz nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die von den Adhäsinen erkannten bzw. gebundenen Kohlehydratkomponenten Glycolipoide oder Glycoproteine sind, die in der äußeren Membran von Säugetierzellen vorkommen.

4. Immobilisierungssubstanz nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der Adhäsine an Säugetier-zellmembranbeständige Glycolipoide oder Glycoproteine artspezifisch erfolgt.

5. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine aus extrazellulären Strukturen von Escherichia Coli-Bakterien isoliert sind.

6. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 5, gekennzeichnet durch Nicht-Fimbrien-assoziierte Adhäsine aus E.coli.

7. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine wasserlöslich sind.

8. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nicht-Fimbrien-assoziierten Adhäsine ein Molekulargewicht in der Größenordnung von 12 000 bis 30 000 Dalton aufweisen.

9. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nicht-Fimbrien-assoziierten Adhäsine im Aggregationszustand ein apparentes Molekulargewicht von etwa  $10^6$  bis  $10^7$  Dalton aufweisen.



10. Immobilisierungssubstanz nach den Ansprüchen 1 bis 6,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine zur Immobilisierung  
von Säugetierzellen und -geweben, insbesondere menschlicher  
Zellen und Gewebe, an Implantate oder künstliche Organe ver-  
wendet werden.

11. Immobilisierungssubstanz nach den Ansprüchen 1 bis 10,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine zur Formulierung  
oder als Wirkstoff von Arzneimitteln oder zur Herstellung  
von Diagnostika Verwendung finden.

12. Immobilisierungssubstanz nach den Ansprüchen 1 bis 11,  
dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine zur Zellkultur  
oder Zelltrennung in vitro Verwendung finden.

13. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis  
12, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine als Gewebe-  
kleber für menschliches oder tierisches Gewebe ausgebildet  
sind.

14. Immobilisierungssubstanz nach einem der Ansprüche 1 bis  
13, dadurch gekennzeichnet, daß die Adhäsine in einer Lösung  
(insbesondere wäßrigen Lösung) vorliegen.

15. Verwendung einer Immobilisierungssubstanz nach einem  
der Ansprüche 1 bis 14 für die Endotheliumbildung an ver-  
pflanzten Gefäßen.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/DE88/00165

International Application No

<b>I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> (if several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl <sup>4</sup> : C 12 N 11/02; A 61 L 27/00; A 61 L 25/00; //C 07 K 3/20		
<b>II. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum Documentation Searched <sup>7</sup>		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl <sup>4</sup>	C 12 N; A 61 L	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the extent that such Documents are included in the Fields Searched *		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *</b>		
Category *	Citation of Document, <sup>11</sup> with indication, where appropriate, of the relevant passages <sup>12</sup>	Relevant to Claim No. <sup>13</sup>
A	Affinity-Chromatography, Principles & Methods" June 1979, Pharmacia Fine Chemicals AB, (Uppsala, SE), see pages 48-51 -----	1-15
<p>* Special categories of cited documents: <sup>10</sup></p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
01 June 1988 (01.06.88)	01 July 1988 (01.07.88)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
European Patent Office		

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE 88/00165

<b>I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS</b> (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) <sup>6</sup> Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC Int. Cl. 4. C 12 N 11/02; A 61 L 27/00; A 61 L 25/00; // C 07 K 3/20		
<b>II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE</b> <div style="text-align: right; margin-right: 50px;">Recherchierter Mindestprüfstoff<sup>7</sup></div>		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int. Cl. 4	C 12 N; A 61 L	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen <sup>8</sup>		
<b>III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN<sup>9</sup></b>		
Art <sup>9</sup>	Kennzeichnung der Veröffentlichung <sup>11</sup> , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile <sup>12</sup>	Betr. Anspruch Nr. <sup>13</sup>
A	Affinity Chromatography, Principles & Methods", Juni 1979, Pharmacia Fine Chemicals AB, (Uppsala, SE), siehe Seiten 48-51  <div style="text-align: center;">-----</div>	1-15
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen<sup>10</sup>:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&amp;" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
<b>IV. BESCHEINIGUNG</b>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. Juni 1988		01 JUL 1988
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
Europäisches Patentamt		 <b>P.C.G. VAN DER PUTTEN</b>